



Toxicidad, genotoxicidad y actividad anti-*Leishmania* de aceites esenciales obtenidos de cuatro (4) quimiotipos del género *Lippia*

[Toxicity, genotoxicity and anti-*Leishmania* activity of essential oils obtained of four chemotypes of *Lippia* genus]

Laura Fernanda Neira¹, Julio Cesar Mantilla², Elena Stashenko³ & Patricia Escobar¹

¹Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (CINTROP)

²PAT-UIS, Escuela de Medicina, Departamento de Patología

³Centro de Investigación en Biomoléculas (CIBIMOL, CENIVAM)

Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

Contactos / Contacts: Patricia ESCOBAR - E-mail address: pescobar@uis.edu.co

Abstract: Essential oils (EOs) belonging to the genus *Lippia* are interesting candidates in pharmaceutical systems for cutaneous leishmaniasis (CL). The aim of this work was to determine both toxicological and antileishmanial activities of EOs obtained from different species of *Lippia*, a widely distributed Colombian plants. BALB/c mice were treated topically or orally with EOs obtained from *L. alba* citral chemotype (EO1) and *L. origanoides* thymol (EO2), carvacrol (EO3) and phellandrene (EO4) chemotypes. The skin irritation, oral acute toxicity, genotoxicity (comet assay and micronucleus test), liver and renal adverse effects, All the EOs showed a toxicological profile similar to the normal parameters, except for oils EO2 and EO3 which were irritant and showed some signs of acute oral toxicity at high concentrations (low concentration were safe). The EO2 showed antiparasitic activity. Low concentrations of the EO could be used safely as components of pharmacological formulations in CL.

Keywords: Colombian plants, *Lippia*, essential oils, chemotypes, toxicity, cutaneous leishmaniasis

Resumen: Los aceites esenciales (AEs), pertenecientes al género *Lippia*, son candidatos interesantes de formulaciones tópicas en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea (LC). El objetivo de este trabajo fue determinar el perfil toxicológico y la actividad anti-*Leishmania* de AEs obtenidos de plantas colombianas del género *Lippia*. Ratones BALB/c fueron tratados tópicamente u oralmente con AEs obtenidos de *L. alba* quimiotipo citral (AE1) y de *L. origanoides* quimiotipos timol (AE2), carvacrol (AE3) y felandreno (AE4). El efecto del tratamiento en la irritación de la piel, la toxicidad aguda oral, la genotoxicidad (prueba cometa y micronúcleos), los cambios en la función hepática y renal, la inducción de reacción de hipersensibilidad de contacto y en la actividad contra *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis* fueron determinados. Todos los AEs presentaron un perfil toxicológico similar a los parámetros normales, exceptuando los aceites AE2 y AE3 los cuales fueron irritantes y presentaron algunos signos de toxicidad aguda oral al ser utilizados en altas concentraciones (concentraciones bajas no fueron tóxicas). El AE2 mostró actividad antiparasitaria en las formas parasitarias evaluadas. Concentraciones bajas de los AEs podrían utilizarse de forma segura como componentes de formulaciones farmacológicas en LC.

Palabras clave: plantas colombianas, *Lippia*, aceites esenciales, quimiotipos, toxicidad, leishmaniasis cutánea

Recibido | Received: 6 de Julio de 2017

Aceptado | Accepted: 22 de Diciembre de 2017

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 26 de Diciembre de 2017

Publicado en línea | Published online: 30 de Enero de 2018

Declaración de intereses | Declaration of interests: Este proyecto fue financiado con recursos del Patrimonio Autónomo Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia la Tecnología y la Innovación Francisco José de Caldas, Contrato RC-0572 del 2012 y a la Universidad Industrial de Santander, al proyecto Colciencias, Contrato RC-687-2014.

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: LF Neira, JC Mantilla, E Stashenko, P Escobar. 2018. Toxicidad, genotoxicidad y actividad anti-*Leishmania* de aceites esenciales obtenidos de cuatro (4) quimiotipos del género *Lippia*. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 17 (1): 68 – 83.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es un conjunto de manifestaciones clínicas producida por protozoarios del género *Leishmania* y transmitida a humanos a través de mosquitos flebótomos. Presenta diferentes formas clínicas que afectan la piel (leishmaniasis cutánea, LC), las mucosas y algunas vísceras (leishmaniasis visceral) (Mohamed, 2017). Constituye un problema de salud pública en 98 países alrededor del mundo, donde 350 millones de personas se encuentran en riesgo, 12 millones están infectadas y 1,3 millones de casos nuevos ocurren anualmente (Patino et al., 2017). Después de Brasil, Colombia es el país de América con mayor incidencia de la enfermedad reportando 10743 de casos en el 2016 de los cuales el 98% eran de LC (Sivigila, 2016). No existe una vacuna y los tratamientos son pocos, basados principalmente en el uso de antimoniales pentavalentes y en caso de falla o contraindicaciones en la utilización de anfotericina B y sus formas liposomales, pentamidina, miltefosina y paromomicina. El panorama es menos alentador debido a que todos ellos pueden presentar inconvenientes o contraindicaciones, efectos tóxicos, eficacia variable, falla terapéutica y abandono de los pacientes al tratamiento debido a su aplicación en protocolos largos y dolorosos (Saldanha et al., 2000; Croft et al., 2005; Velez et al., 2009; Ezzine et al., 2010; Croft et al., 2011).

Las plantas y sus derivados constituyen una opción terapéutica interesante en LC. Han sido utilizadas en la medicina tradicional en formas de emplastos, lociones, infusiones para curar las heridas y algunos extractos, aceites esenciales o componentes de plantas v.g. del género *Lippia*, *Piper*, *Croton*, *Adenia*, *Cymbopogon* y *Rosmarinus*, han mostrado actividad anti-*Leishmania* en el laboratorio (Escobar et al., 2010; Brito et al., 2013; Leal et al., 2013; Monzote et al., 2014a; Monzote et al., 2014b; Neira et al., 2014; Pastor et al., 2015). A pesar de sus propiedades medicinales, los derivados naturales pueden causar reacciones en la piel tales como dermatitis de contacto alérgica o irritante debido a que pueden promover la liberación de histamina y otros mediadores inflamatorios, reacciones fototóxicas y urticaria (Kanerva, 2000; Bleasel et al., 2002; Fernandes et al., 2007). Igualmente han sido asociados a casos de intoxicaciones al ser ingeridos provocando vómitos, convulsiones y fiebre (Averbeck et al., 1990; Tisserand y Young, 2014). La toxicidad de los bioderivados puede deberse a uno o

varios de los componentes químicos que poseen (tales como fenoles, aldehídos y alcoholes) y/o la naturaleza lipofílica de algunos los cuales permiten el paso a través de las membranas celulares, alterando su estructura u organización dinámica de la bicapa lipídica, aumentando la permeabilidad, la pérdida de iones, la reducción del potencial de membrana mitocondrial, el colapso de la bomba de protones y la depleción del ATP (Bruni et al., 2004; Turina et al., 2006).

El género *Lippia* Houtt (familia Verbenaceae) comprende alrededor de 200 especies distribuidas por Centro y Sudamérica y África Tropical. Son plantas aromáticas, de olor penetrante, empleadas en culinaria y en medicina popular de donde se extraen aceites esenciales (AEs) los cuales han mostrado actividades biológicas diversas, v. g. antifúngicas, antibacterianas, antiparasitaria, insecticida, fungicida, antiinflamatoria y antioxidante (Escobar et al., 2010; Stashenko et al., 2013; Vera et al., 2014). Los AEs son una mezcla de componentes volátiles, productos del metabolismo secundario de las plantas, en donde dependiendo de la concentración de sus compuestos pueden ser clasificados en quimiotipos. En *L. alba* se han encontrado quimiotipos como citral y carvona (en Colombia), geraniol, *trans*- β -cariofileno, limoneno y biciclosesquifelandreno (en Brasil) y linanol en Uruguay (Lorenzo et al., 2001; López et al., 2011). En plantas de *L. origanoides* se han identificado quimiotipos como el timol, carvacrol, felandreno ρ -cymeno/*trans*- β -cariofileno. Las diversas actividades biológicas que presentan los AEs (v. g. antioxidante, antígeno tóxica, citotóxica antimicrobiana, antifúngica quimiopreventiva, neurosedante y analgésica) dependen algunas veces del quimiotipo implicado (Viana et al., 1998; Puertas-Mejía et al., 2002; Betancur et al., 2011; López et al., 2011; Stashenko et al., 2014). Algunos quimiotipos de AEs han presentado efectos adversos donde por ejemplo la administración intraperitoneal del quimiotipo citral ha estado asociada con daño neurológico y hepático en los animales tratados (Olivero-Verbel et al., 2010). Es necesario evaluar sus propiedades toxicológicas (no benéficas) de los productos naturales antes de su uso.

Existen organizaciones internacionales interesadas en la aplicación de políticas nacionales que garanticen el desarrollo responsable de biotecnologías como la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos OCDE la

cual ha se ha centrado en la evaluación y valoración de productos químicos que aseguren la salud humana y la seguridad ambiental (Kearns et al., 2009). Se han desarrollado protocolos que evalúan la toxicidad y genotoxicidad en modelos experimentales determinando la irritación dérmica (de Oliveira et al., 2014). Igualmente se ha determinado la fototoxicidad en líneas celulares (Kejlová et al., 2007; Ceridono et al., 2012), la hipersensibilidad de contacto HC (Ceridono et al., 2012), las alteraciones en la función hepática y renal (Liu et al., 2004), la fragmentación del ADN por el ensayo cometa alcalino (Llana et al., 2014) y la formación de micronúcleos (OCDE, 2014).

El objetivo de este trabajo fue determinar la toxicidad (irritación dérmica, hipersensibilidad de contacto, toxicidad aguda oral, cambios histopatológicos, pruebas de función renal y hepática), genotoxicidad (fragmentación del ADN) y actividad anti-*Leishmania* contra *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis* de AE obtenidos de cuatro (4) quimiotipos del género *Lippia*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aceites esenciales (AE) y reactivos

Se utilizaron AEs obtenidos de plantas colombianas de *L. alba* quimiotipo citral AE1, de *L. origanoides* quimiotipo timol AE2, quimiotipo carvacrol AE3, quimiotipo felandreno AE4. Los AEs fueron extraídos y caracterizados por el Centro de Investigación en Biomoléculas-Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de especies vegetales aromáticas y medicinales tropicales (CIBIMOL-CENIVAM) (Stashenko et al., 2014). El forbolmiristato acetato (PMA, siglas en inglés), MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difeniltetrazolio bromuro], dinitrofluorobenceno (DNFB), ciclofosfamida (CPA, siglas en inglés), etil metil sulfonato (EMS), Hoesch 33342 (bisBenzimide), anfotericina B y medio de cultivo *insect Schneider's* fueron obtenidos de Sigma Aldrich® (St. Louis, MO, USA) y el dimetilsulfoxido (DMSO) fue obtenido de Carlo Erba (Rodano, Italia). Las agarosas utilizadas fueron: agarosa con punto de fusión normal y agarosa con bajo punto de fusión (Mo Bio Laboratories Ltda, USA). El medio de cultivo RPMI 1640, suero bovino fetal (SBF) y tripsina-EDTA fueron obtenidos de Gibco (Grand Island, NY, USA).

Ensayos in vivo

Consideraciones éticas

Los estudios fueron desarrollados de acuerdo con la guía y protocolos para el cuidado y uso de animales de laboratorio aprobado por el Comité de Ética (Código D16-00730) de la Universidad Industrial de Santander.

Animales

Ratones hembras nulíparas BALB/c de 8 a 10 semanas de edad, fueron obtenidos de cepas endogámicas del Instituto Nacional de Salud (Bogotá, Colombia). Fueron mantenidos en jaulas de polisulfonato con agua y alimento *ad libitum*, fotoperíodo de 12/12 h luz/oscuridad, temperatura y humedad relativa entre 20-25° C y 55 ± 5% respectivamente. Los animales fueron seleccionados al azar para conformar los grupos experimentales.

Inducción de irritación dérmica

El ensayo de inducción de irritación dérmica fue realizado siguiendo el método descrito en la guía N. 404 de la OECD con modificaciones (OECD, 2015) utilizando un solo animal. Los animales fueron afeitados en el dorso (área de 3 x 2 cm) y después de 24 h fueron tratados tópicamente con 50 µL de los AEs. Las reacciones dérmicas fueron monitoreadas 1, 24, 48 y 72 h post tratamiento (pt). Los AEs que mostraron signos de irritación fueron evaluados a concentraciones de 50 y 10%. Los signos de eritema y/o edema fueron registrados durante 14 días. El sacrificio de los animales se realizó utilizando anestésicos (Xilacina y Ketamina, X/K) con posterior dislocación cervical (Leary et al., 2013). Se obtuvieron muestras de piel del sitio de aplicación para estudios histopatológicos. Las reacciones dérmicas de irritación (edema y/o eritema) fueron evaluadas por visualización macroscópica diaria clasificadas como: 0 - ausencia, 1 = ligero, 2 = leve, 3 = moderada, 4 = grave irritación. Los animales fueron sacrificados a los 14 días pt.

Hipersensibilidad de contacto

Fue determinada utilizando la prueba de inflamación de la oreja inducido por un agente sensibilizante basados en Man et al., 2012. Los ratones BALB/c fueron tratados tópicamente en el dorso de los ratones con los AEs y el control sensibilizante de DNFB 0,5% utilizando una (1) dosis diaria por 2 días. Una semana después se aplicó la dosis de reto en una de las orejas y en la otra oreja se aplicó el vehículo

(aceite de oliva). Se midió el diámetro de cada una de las orejas (mm) utilizando un *caliper* digital a las 24 y 48 h. Los ratones fueron sacrificados 24 h después de la última medición con una mezcla X/K y dislocación cervical. Las muestras de orejas fueron cortadas con tijeras quirúrgicas y dejadas en un frasco con formalina 10% para procesamiento histológico.

Análisis histopatológico en piel

Se realizó de acuerdo con el manual de procesos y procedimientos del Laboratorio de Patología de la UIS. Las biopsias de piel en formalina al 10% fueron sometidas a un proceso de deshidratación utilizando una serie de soluciones acuosas de menor a mayor concentración de alcohol etílico. Posteriormente las muestras fueron embebidas en bloques de parafina. Se realizaron cortes histológicos de 5 µm de grosor utilizando un micrótopo RM2135 (Leica Microsystems®) los cuales fueron colocados en láminas portaobjetos y coloreados con hematoxilina y eosina (H-E). Los parámetros histopatológicos analizados microscópicamente fueron: acantosis, paraqueratosis, espongirosis, exocitosis e infiltración dérmica, presencia de eosinófilos, clasificados en: (-) ausencia, (±) equivoca, (+) leve, (++) moderado y (+++) severo según Shen *et al.*, 2008.

Toxicidad aguda oral

El ensayo fue realizado según la guía N°. 423 de la OECD con modificaciones (OECD, 2002). Los ratones (n = 3/grupo) fueron tratados con una dosis máxima de 2000 mg/Kg. La variación en el peso (g), los cambios en el comportamiento y disminución en la ingesta de alimento fueron registrados. Se determinó la concentración de urea (BUN, mg/dL), fosfatasa alcalina (FA, U/L) y aspartato aminotransferasa (AST/GOT, U/L) en suero utilizando pruebas comerciales. Los ensayos fueron validados utilizando sueros control de bioquímica (Biosystems, Barcelona, España).

Después del sacrificio se recolectaron biopsias de hígado, riñón y bazo las cuales fueron fijadas en formalina 10%. Las muestras fueron analizadas microscópicamente por dos observadores independientes. Se determinó la presencia o ausencia de aglomeraciones capilares, fibrosis y necrosis en el hígado; las alteraciones en la arquitectura de las pulpas esplénicas y la formación de granulomas en el riñón.

Genotoxicidad

Los ensayos fueron realizados siguiendo la guía N° 747 de la OECD con modificaciones (OECD, 2014). Los ratones (n=3/grupo) fueron tratados oralmente con una dosis diaria de 100 mg/Kg por 14 días. Como control de genotoxicidad se utilizó la CPA y el EMS a 50 y 300 mg/Kg, respectivamente por vía intraperitoneal. Los ratones fueron sacrificados con una mezcla X/K según lo descrito anteriormente. Se realizó punción cardiaca para la obtención de sangre total para el ensayo cometa. Los fémures fueron removidos para la obtención de médula ósea para la prueba de micronúcleos.

Ensayo cometa alcalino

Se realizó teniendo en cuenta el protocolo descrito por Tice *et al.*, 2000 con algunas modificaciones (Neira *et al.*, 2016). Una muestra de sangre (30 µL) fue mezclada con agarosa de bajo punto de fusión 0,5% (p/v) PBS, pH 7,4 a 37° C y adicionada sobre una lámina portaobjeto previamente cubierta con agarosa normal al 1,5% en PBS pH 7,2 por 20 min a 4° C. Posteriormente las láminas se colocaron en solución de lisis por 24 h y fueron sumergidas en la solución tampón alcalina pH > 13 a 4° C durante 30 min. Después de este periodo, se inició la electroforesis a 25 V/300 mA durante 30 min. Las láminas fueron inmersas en la solución tampón de neutralización (pH 7,5). Las láminas fueron analizadas en el microscopio de epifluorescencia (Nikon eclipse E400, filtro UV2A, Ex:330-380, DM: 400, BA:420) utilizando como colorante de ADN, 10 µg/mL de Hoesch 33342 (Sigma-Aldrich®). Se tomaron registros utilizando una cámara fotográfica (Nikon Coolpix P600, Japan).

Los resultados fueron expresados como la fragmentación de ADN por medio del análisis visual de los cometas (recuento de 100 núcleos/por cada animal), basándose en la clasificación de 0 a 4 de acuerdo con la intensidad de fragmentación, donde 0 (sin daño) y 4 (daño severo). El índice de daño (ID) fue calculado de acuerdo a lo propuesto por Jałoszyński *et al.*, 1997) a partir de la fórmula. $ID = \text{N}^\circ \text{ de células de (clase 1x1) + (clase 2x2) + (clase 3x3) + (clase 4x4) / \text{total de células analizadas}$. A partir del ID se calculó el porcentaje de daño total de ADN.

Ensayo de micronúcleos en médula ósea

Las epífisis de los fémures fueron cortadas y se realizaron lavados con jeringa conteniendo SBF en

tubos cónicos plásticos. La suspensión fue homogenizada y centrifugada a 1000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue removido y el sedimento fue suspendido en 50 µL de SBF. Se realizaron extendidos en láminas portaobjetos las cuales fueron fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa. Las láminas fueron analizadas al microscopio de luz. Para cada lámina, se contaron 1000 células. La frecuencia de micronúcleos fue evaluada en 1000 eritrocitos policromáticos EPC.

Ensayos in vitro

Células y parásitos

Promastigotes de *L. (V.) panamensis* (MHOM/PA/71/LS94) y *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) fueron cultivados en medio de cultivo celular Schneider suplementado con 10% de SBFi a 28° C. Las células de monocitos leucémicos humanos, THP-1 (ATCCTIB-202) se mantuvieron en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de SBFi a 37° C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Los amastigotes intracelulares de fueron obtenidos infectando las células THP-1 diferenciadas con PMA con promastigotes en fase estacionaria de crecimiento, en una proporción parásito: célula de 5:1 por 48 h.

Ensayos de susceptibilidad

Las células THP-1, los promastigotes y amastigotes de *Leishmania* fueron tratados con diluciones seriadas 1:3, por cuadruplicado, de los AEs (3,7-100 µg/mL). Células y parásitos control fueron mantenidas sin AE. La toxicidad en células fue determinada por el método de colorimétrico de MTT por espectrofotometría utilizando un lector de microplacas (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO) y una longitud de onda de 580 nm. El porcentaje de citotoxicidad fue calculado mediante la fórmula: Porcentaje de citotoxicidad = 100* (DO grupo control - DO grupo tratado)/DO grupo control. La inhibición del crecimiento de los parásitos fue determinada microscópicamente, en promastigotes por conteo directo de parásitos vivos y muertos en cámara de Neubauer y en amastigotes por conteo de células infectadas y no infectadas en preparaciones fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa. Los ensayos fueron repetidos dos veces. La actividad de los AEs en células fue expresada como la concentración citotóxica para el 50% de las células (CC₅₀) y en los parásitos como la concentración que inhibe el crecimiento de 50% de los parásitos (CE₅₀).

Estos valores fueron calculados por regresión sigmoideal utilizando el software Mxslfit™ (ID Business Solution, UK). El índice de selectividad (IS) fue determinado dividiendo la CC₅₀/CE₅₀ (células/parásitos). La actividad de los AEs con un IS de tres o superior fue considerada selectiva contra los parásitos.

Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de ANOVA de una vía para comparar los diferentes grupos. Un valor de p < 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Irritación dérmica

El tratamiento con los aceites AE2 y AE3 al 100% (sin diluir) indujo eritema y edema de severo a grave en la zona expuesta de los ratones observándose en las primeras 24 h un enrojecimiento de la piel, seguido de la formación de costra a los 7 días pt y persistencia de la lesión hasta el día 14 pt como se muestra en la Figura 1. A una concentración menor (del 50%) los dos AEs mostraron un ligero enrojecimiento en la zona de exposición las primeras 24 h, efecto que posteriormente fue reversible. Al 10%, estos aceites (AE2 y AE3) no fueron irritantes.

El tratamiento tópico con los aceites AE1 y AE4 no fue irritante en ninguna concentración.

A nivel histopatológico, el tratamiento con los aceites AE2 y AE3 indujo severas alteraciones en las capas de la piel como la acumulación de fibrina y leucocitos (impétigo), visualización de los desmosomas (espongiosis), aumento en la proliferación celular (acantosis), núcleos en las células del extracto corneo (paraqueratosis) e invasión de leucocitos (exocitosis) en la epidermis. En la dermis se observó la dilatación de los capilares sanguíneos y alteraciones en las fibras dérmicas, sin embargo, la capa basal de la epidermis fue mantenida indicando la reepitelización de esta capa y reversibilidad de los efectos. El tratamiento con los aceites AE1 y AE4 no indujo alteraciones en las capas de la piel, siendo considerados como AEs no irritantes (Ver Tabla N° 1 y Figura N° 2).

Hipersensibilidad de contacto

Ninguno de los AEs mostró signos de engrosamiento de las orejas después de la dosis reto. Contrariamente, el reto con el control positivo (DNFB) indujo engrosamiento de 0,85 ± 0,1 mm vs 0,13 ± 0,02 mm, formación de eritema, costra y una exacerbación de la

respuesta inflamatoria. Después de 48 a 72 h, la respuesta disminuyó. El tratamiento con DNFB indujo un aumento del infiltrado leucocitario en la dermis y epidermis y espongiosis en la lámina basal. Se observaron eosinófilos en la dermis y epidermis

indicando la existencia de hipersensibilidad. También se observó incremento de la permeabilidad vascular resultando en extravasación de eritrocitos y edema papilar dérmico con deposición de fibrina en la dermis reticular (Figura N° 3).

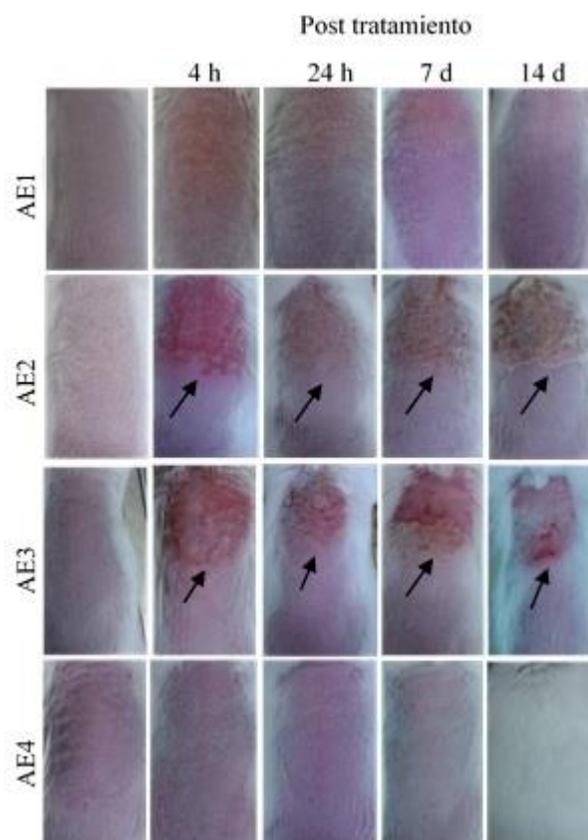


Figura N° 1

Visualización y seguimiento de los efectos los AEs (al 100%) sobre la piel de los ratones BALB/c. Las flechas indican las zonas de la piel expuestas a los AE2 y AE3 que mostraron signos de irritación (eritema y formación de costra). El AE1y el AE4 no muestra efectos adversos en la piel.

Tabla N° 1

Características histológicas de piel de ratón BALB/c tratados vía tópica con los AEs

La tabla muestra las alteraciones histopatológicas observadas en las capas de la dermis y la epidermis

AEs	IM	ES	PQ	EX	AC	DC	Otros
AE1	-	-	-	-	-	-	Ninguno
AE2	+++	++	++	++	+++	+++	Formación costra
AE3							Formación costra
AE4	-	-	-	-	-	-	Ninguno

IM: impétigo, ES: espongiosis, PQ: paraqueratosis, EX: exocitosis, AC: acantosis, DC: dilatación de capilares. Parámetros histológicos evaluados semi-cuantitativo (-, ausencia; +/-, inequívoco; +, leve; ++, moderado; +++ severo). Los valores fueron obtenidos de las áreas histológicas más dominantes. pt: post tratamiento

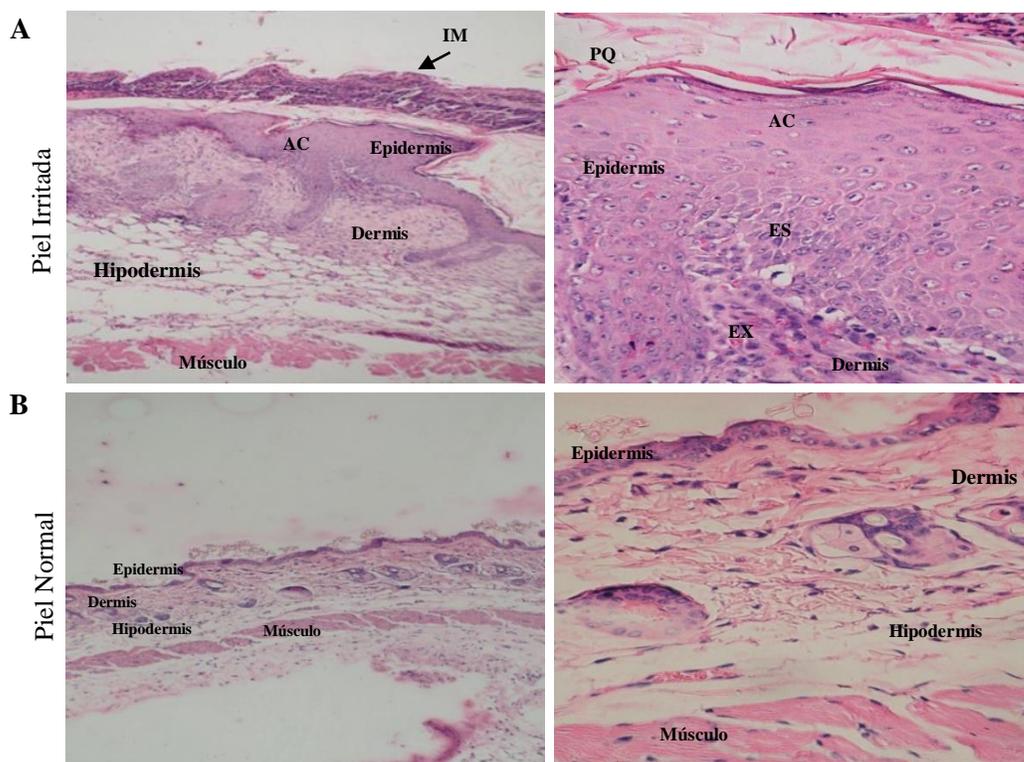


Figura N° 2

Cortes histológicos de piel de ratón BALB/c tratados con los AEs.

- A.** La primera fila muestra alteraciones histopatológicas de las capas de la piel (epidermis, dermis e hipodermis), observando en la epidermis PQ: paraqueratosis, AC: acantosis, ES: espongiosis y en la dermis EX: excitosis leucocitaria producidas por el AE2 en una sola dosis al 100% en aumentos de 100 y 400x.
- B.** La segunda fila muestra las capas de la piel normal (epidermis, dermis e hipodermis) sin alteraciones en aumentos de 100 y 400x.

Toxicidad aguda oral

Utilizando una dosis máxima oral de 2000 mg/Kg los aceites AE2 y AE3 mostraron toxicidad. El AE3 mostró signos de toxicidad ligera en el momento de administrar la dosis observándose desorientación en el comportamiento de los animales en las primeras 8 h, normalizándose el efecto 24 h pt. Después del tratamiento con el aceite AE2 uno de los ratones murió una hora pt. El resto presentaron signos de aturdimiento por 8 h normalizándose 24 h pt.

Los animales tratados con los aceites AE1 y AE4 no mostraron signos clínicos asociados a efectos

tóxicos sistémicos registrándose un 100% de supervivencia. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el peso de los animales antes y después del tratamiento (peso de $22,47 \pm 0,9$ g versus $22,74 \pm 1,0$ g) No se observaron signos de dolor ni alteraciones en el comportamiento durante los días de tratamiento. El peso y el consumo de alimento diario fue el esperado denotando bienestar de los mismos. El análisis macroscópico de los órganos no mostró ninguna alteración, presentado un aspecto normal.

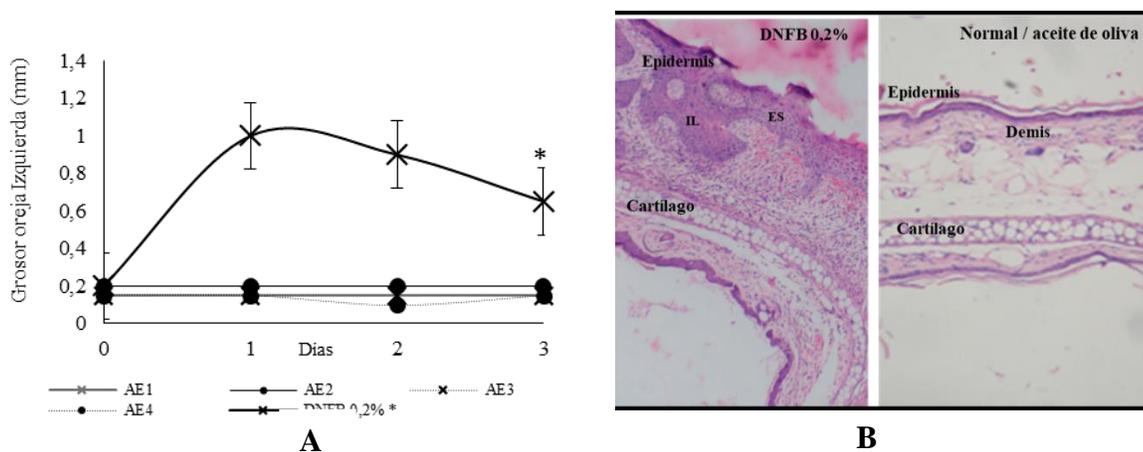


Figura N° 3

Hipersensibilidad de contacto en el modelo murino BALB/c.

- A.** La gráfica muestra las mediciones del grosor de las orejas los días 1, 2 y 3 post dosis reto de los AEs. Diferencias significativas $p < 0,001$ fueron encontradas entre el grupo control DNFB con respecto los ratones tratados con AEs.
- B.** En el recuadro, la primera foto muestra cortes histológicos de orejas de ratones tratados con DNFB observándose alteraciones histopatológicas como ES: spongiosis, IL: infiltrado leucocitario y eritrocitario y presencia de eosinófilos >15 células/campo. la segunda foto muestra la estructura normal microscópica de orejas tratadas con el vehículo aceite de oliva. Visualización de las fotografías a 100x de aumento.

Se encontraron niveles normales de urea (entre 34,16 a 70 mg/dL) y de la transaminasa AST/GOT (valores entre 69,55 a 80,10 U/L) en suero después del tratamiento oral con los AEs. Después del tratamiento con los aceites AE2 y AE3 se observaron niveles elevados de FA con valores de 82,32 y 559,80 U/L

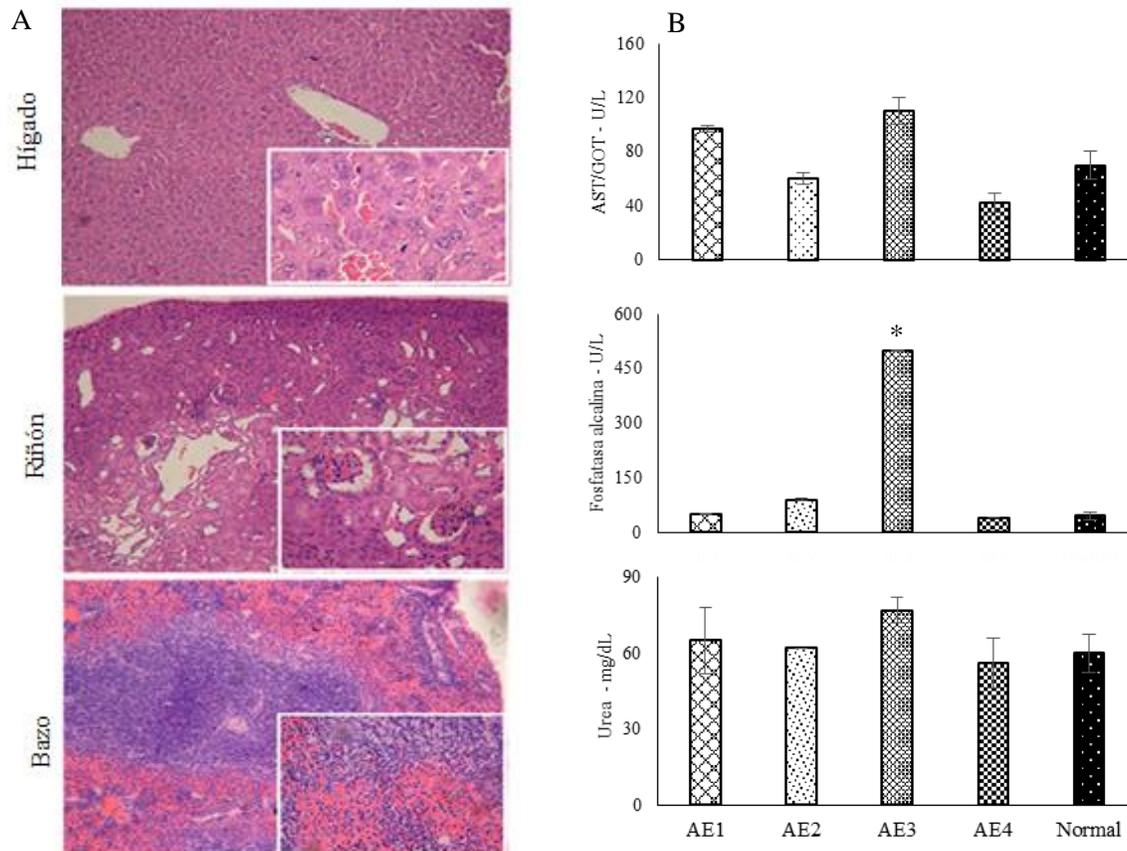
respectivamente (valor normal de 23,95 a 55,46 U/L). Este resultado sugiere un posible daño hepático transitorio. En las biopsias de órganos no se observaron alteraciones histopatológicas (Figura N° 4).

Figura N° 4**Toxicidad aguda en ratones BALB/c expuestos a una sola dosis de 2000 mg/Kg**

A. En la primera columna se observan cortes histológicos de hígado, riñón y bazo donde no se observan alteraciones en las estructuras a 400 y 1000x de aumento

B. En la segunda columna se muestran las concentraciones en suero de las enzimas hepáticas (AST/GOT y fosfatasa alcalina FA) y el metabolito urea, indicadores de daño hepático y renal

* Diferencias significativas $p < 0,05$

**Ensayos de genotoxicidad**

El esquema de tratamiento utilizado en este estudio (100 mg/Kg por 14 días/vía oral) no indujo alteraciones físicas como pérdida o aumento de peso ni signos de dolor. El tratamiento indujo un daño leve en el ADN con valores de daño entre el 23 y 30%. El daño inducido por el control positivo (CPA+EMS) fue tres veces mayor ($74,9 \pm 3,2\%$) con diferencias

significativas ($p < 0,001$) entre ellos (Ver Figura N° 5).

Los AEs no mostraron formación de micronúcleos en eritrocitos policromáticos de medula ósea. En contraste, el control positivo de genotoxicidad CPA+EMS mostró una frecuencia de $175 \pm 18,8$ MN en 1000 eritrocitos policromáticos EPC.

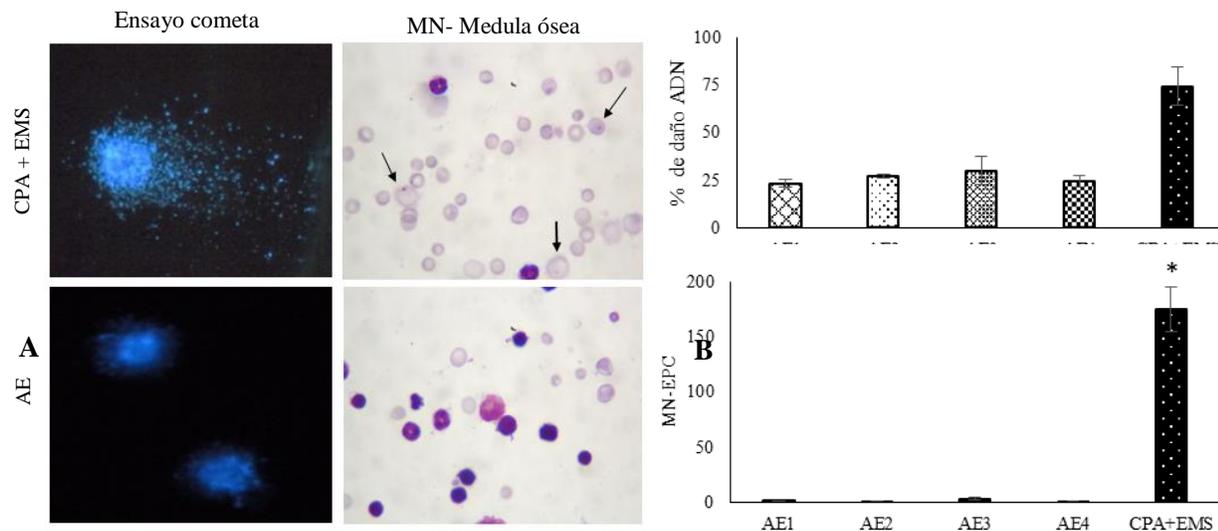


Figura N° 5

Efectos genotóxicos producidos por los AEs utilizando el ensayo cometa y micronúcleos.

A. La primera columna muestra la fragmentación de las células sanguíneas producida por el control genotóxico CPA+EMS en contraste con el efecto producido por los AEs. En la segunda columna, se observan extendidos de medula ósea en donde se observan en la parte superior indicando por las flechas eritrocitos policromáticos con MN, mientras que, en la foto inferior, no se observan MN en los ratones tratados con AEs. Las fotografías fueron tomadas a 1000x.

B. Las gráficas muestran el porcentaje de daño el ADN y el número de MN inducido con el tratamiento con AEs. *Diferencias significativas $p < 0,001$ fueron encontradas entre el grupo control CPA+EMS con respecto los ratones tratados con AEs

Actividad contra *Leishmania* y células THP-1

Todos los AEs fueron activos contra las formas extracelulares de *L. (V.) braziliensis*. Los aceites AE1 y AE2 mostraron además actividad contra la forma intracelular del parásito siendo 2,8 y 3,4 veces más selectivo para el parásito que para las células (Ver IS Tabla N° 2). El AE2 mostró mayor actividad contra amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis*. La

anfotericina B mostró mayor actividad antiparasitaria contra amastigotes intracelulares de *L. (V.) braziliensis* que contra *L. (V.) panamensis* con IS de 196 y 32, respectivamente. Los AE mostraron efectos tóxicos en las células THP-1 siendo del más tóxico al menos tóxico AE1>AE3>AE2>AE4 (Ver Tabla N° 2).

Tabla 2
Actividad biológica de aceites esenciales del género *Lippia* contra parásitos de *Leishmania* y células THP-1.

Aceite esencial	CE ₅₀ (µg/mL±DS)						CC ₅₀ (µg/mL±SD)
	<i>L. (V.) panamensis</i>		<i>L. (V.) braziliensis</i>				THP-1
	Amastigotes	IS	Promastigotes	IS	Amastigotes	IS	
AE1	63,87 ± 6,2	0,4	8,88 ± 1,84	2,9	9,19 ± 2,1	2,8	26,27 ± 0,7
AE2	42,66 ± 2,0	1,2	0,39 ± 0,079	134,7	15,43 ± 0,9	3,4	52,55 ± 8,1
AE3	89,29 ± 4,2	0,5	0,57 ± 0,037	76,7	>100	ND	43,72 ± 10
AE4	>100	ND	11,18 ± 1,63	6,8	>100	ND	76,30 ± 7,5
AmB	0,49 ± 0,18	32	ND	ND	0,08 ± 0,1	196	15,73 ± 1,2

AmB: anfotericina B; CE₅₀: concentración efectiva 50; CC₅₀: concentración citotóxica 50; DS: Desviación estándar; ND: No determinado; IS: Índice de selectividad

DISCUSIÓN

Los compuestos naturales derivados de plantas constituyen una alternativa en el tratamiento de la LC solos o como componentes de formulaciones de uso tópico o sistémico. En el diseño de un bioproducto es importante tener en cuenta no sólo la capacidad que tienen sus componentes de inhibir o destruir los parásitos de *Leishmania* sino el riesgo de producir reacciones adversas.

En este trabajo se encontró que aquellos AEs compuestos mayoritariamente por timol y carvacrol (aceites AE2 y AE3) fueron irritantes en piel. La composición de estos AEs, determinada en un trabajo previo (Stashenko *et al.*, 2014), mostró que el AE2 estaba compuesto mayoritariamente por timol 54,5%, γ -terpineno 5,0%, acetato de timilo 4,8%, *trans*- β -cariofileno 2,4% y el AE3 por carvacrol 46,2%, *p*-cimeno 12,0%, timol 9,9 y γ -terpineno 9,5%. En otro estudio, la aplicación tópica de AEs obtenidos del *Thymus vulgaris* (compuesto mayoritariamente de timol y carvacrol) y del componente mayoritario carvacrol (10 mg/en cada oreja) no indujeron un efecto irritante en la piel de los animales, sin embargo, la administración tópica del timol utilizado en esta misma concentración indujo un efecto irritante con liberación de histamina y enzimas proinflamatorias (Fachini-Queiro *et al.*, 2012). Ha sido demostrado que el efecto irritante de timol es similar al causado por un AE obtenido de *Croton*

causando daño celular y activación de la fosfolipasa A2 con posterior liberación del ácido araquidónico y producción de prostaglandinas por COX-1 y COX-2 y leucotrienos por la 5-lipoxigenasa los cuales son mediadores inflamatorios implicados en el edema y la migración de leucocitos (Kremmyda *et al.*, 2011; Fachini-Queiro *et al.*, 2012). Adicionalmente, la utilización tópica de algunos AEs obtenidos de *L. sidoides* (compuesto por timol 70,97% y carvacrol 0,3%) han sido irritantes mostrando un aumento en el grosor de la piel, formación de edema y eritema, pérdida de hidratación y elasticidad. Menores concentraciones de estos AEs (al 12% por 7 días) reducen los efectos mostrando solo una ligera formación de edema y eritema la cual es reversible (de Oliveira *et al.*, 2014; Veras *et al.*, 2013). En este trabajo los aceites AE1 y AE4 (los cuales no contienen timol) no fueron irritantes al aplicarlos puros sobre la piel de los animales. El AE1 está compuesto principalmente por el *trans*- β -cariofileno 11,3%, *p*-cimeno 11,2%, α -felandreno 9,9%, limoneno 7,2% y el AE4 por *trans*- β -cariofileno 11,3%, *p*-cimeno 11,2%, α -felandreno 9,9%, limoneno 7,2%, β -felandreno 6,5% (Stashenko *et al.*, 2014).

Existen pocos trabajos que muestran los efectos adversos de los AEs del género *Lippias* al ser ingeridos. En este trabajo una dosis límite de 2000 mg/Kg con el AE3 mostró una tasa de sobrevivencia

del 50%, los otros AEs fueron seguros. Los animales no mostraron alteraciones en los perfiles bioquímicos en suero ni en los parámetros histopatológicas a excepción de los ratones tratados con el aceite AE3 que mostraron un ligero incremento de la fosfatasa alcalina. Estos resultados concuerdan con un experimento realizado en ratas Wistar, donde después del tratamiento con una dosis única oral de 120 mg/kg de un AE obtenido de *L. organoides* (compuesto por carvacrol 29,0%, o-cymene 25,6%, metil timil éter 13,8%) los animales no mostraron alteraciones hematológicas, bioquímicas ni histopatológicas (Andrade et al., 2014). En otro estudio, ratones tratados vía oral con una sola dosis (1500 mg/Kg) de un AE de *L. alba* quimiotipo citral (compuesto por geranial 45,3%, neral 30,23% β -farnesol 7,78%, cariofileno 2,85%) mostró una tasa de sobrevivencia del 60%. Dosis menores (de 300 y 900 mg/Kg) mostraron una sobrevivencia del 100% con signos leves de ataxia, letargia, salivación y convulsiones transitorias. Los autores sugieren que el efecto producido por este quimiotipo sobre el sistema nervioso central podría deberse a la actividad inhibitoria del citral sobre la síntesis del ácido retinoico, metabolito esencial para la diferenciación y desarrollo neuronal (Zhang et al., 2009; Aular et al., 2016).

Uno de los mayores inconvenientes del uso de los AEs es la dermatitis de contacto alérgica. Esto ha sido reportado en personas que manipulan productos cosméticos y fragancias a base de AEs tales como el AE de cananga, lavanda, citronela (*lemongrass*) entre otros (Bleasel et al., 2002). Este efecto adverso ha sido demostrado en ensayos utilizando parches dérmicos conteniendo mezclas con fragancias a base de citral, geraniol y farsenol entre otras (Mowitz et al., 2017). La evaluación del citral como fragancia al 2% en parches ha mostrado irritación y alergia en humanos (Heydorn et al., 2003). En el presente estudio los ratones sensibilizados con los AEs no indujeron signos (ni macro ni microscópicos) de dermatitis de contacto después del reto. Estos resultados concuerdan con otros estudios en los cuales algunos de los componentes de los AEs estudiados (como el timol y carvacrol) han mostrado actividades, al contrario, propiedades antialérgicas actuando como agonistas de receptores en neuronas sensoriales (Mihara y Shibamoto, 2015). Además el carvacrol ha sido estudiado como antiinflamatorio en modelos murinos reduciendo la formación de edema al utilizarse a 50

mg/Kg oralmente (Silva et al., 2012). Igualmente el citral como compuesto mayoritario del AE de *Litsea cubeba* ha mostrado actividad inmunosupresora en células dendríticas derivadas de médula ósea inhibiendo la HC en ratones inducida por DNFB disminuyendo la liberación del factor de necrosis tumoral (TNF)- α y la interleuquina IL-12 (Chen et al., 2016). El modelo murino utilizado en el presente trabajo sirve como marco para el entendimiento de este tipo de alergia en los humanos, siendo considerado por varios autores como un modelo confiable para evaluar la dermatitis de contacto alérgica (Kaplan et al., 2012; Röse et al., 2012). Se conoce que el DNFB (control positivo utilizado en este estudio) induce una reacción de hipersensibilidad tipo IV mediada por células T en ratones observándose histológicamente una dermatitis espongiótica con severo grado de edema intra e intercelular debido a la potente respuesta inmune que induce el DNFB 72 h después del reto (Cho y Hough, 1986; Taylor, 1986, Röse et al., 2012). Estos mismos resultados fueron encontrados en este estudio.

Los AEs del género *Lippia* no indujeron la fragmentación del ADN ni la formación de micronúcleos encontrándose sólo valores mínimos los cuales son considerados como basales (Neira et al., 2016). Estudios de genotoxicidad *in vitro* han sido realizados utilizando otros AEs y sus componentes mayoritarios. Utilizando el método de SOS cromotest (que mide mutagenicidad), uno de los componentes del AE de *L. alba*, el limoneno, mostró actividad genotóxica en dosis entre 97 y 1549 mM, sin embargo tanto el AE como otro de sus componentes el citral no fueron genotóxicos (López et al., 2011). Por el contrario, algunos AEs del género *Lippia*, especialmente AEs obtenidos de *L. organoides* quimiotipos carvacrol y timol, han mostrado efecto genoprotectivo contra el daño en el ADN inducido por radiación ultravioleta (Quintero et al., 2017). Por otro lado, ensayos encaminados a implementar los AEs y sus componentes como conservantes en alimentos mostraron su inocuidad, donde dosis orales de 81 a 810 mg/Kg de carvacrol no promovieron efectos genotóxicos o daño oxidativo del ADN en ratas (Llana et al., 2016). Con respecto a los resultados encontrados con los controles de genotoxicidad utilizados en el presente estudio, CPA y EMS, los cuales además son los establecidos en las guías internacionales de evaluación de sustancias químicas (OCDE, 2014; OCDE, 2016), los resultados encontrados fueron los esperados garantizando de

esta manera la capacidad de la técnica al detectar específicamente los daños en el ADN y no los efectos tóxicos de muerte celular que pudieran presentarse. Los anterior es importante ya que esta diferencia es necesaria en la interpretación de los resultados (Vasquez, 2010).

Con relación a la actividad anti-*Leishmania*, el AE2 (quimiotipo timol) fue el que mejor actividad mostró contra las diferentes formas parasitarias evaluadas con IS en promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. (V.) braziliensis* de 134,7 y 3,4 respectivamente. Este efecto no fue observado en *L.(V.) panamensis* sugiriendo una actividad dependiente de la especie de *Leishmania* evaluada (Escobar et al., 2010). Ensayos posteriores *in vivo* con este quimiotipo utilizando concentraciones no tóxicas son necesarios. La actividad anti-*Leishmania* de los AEs ha sido demostrada en una amplia variedad de AEs como *Cinnamodendron dinisii*, *Matricaria chamomilla*, *Myroxylon peruiferum*, *Salvia sclarea*, *Bulnesia sarmientoi*, *Ferula galbaniflua*, *Siparuna guianensis* y *Melissa officinalis* (Andrade et al., 2016). Ensayos en ratones BALB/c infectados con *L. (L.) amazonensis* mostraron la efectividad del tratamiento con un AE obtenido de *Chenopodium ambrosioides* (30 mg/kg/14 días intralesional) la cual fue mayor que los tratados con Glucantime (28 mg/kg). En este trabajo el tratamiento con sus componentes mayoritarios (ascaridol, carvacrol y óxido de cariofileno) no fue efectivo (Monzote et al., 2014a).

CONCLUSIÓN

En este trabajo se demostró que el tratamiento tópico con los AEs obtenidos de *L. organoides* quimiotipos timol (AE2) y carvacrol (AE3) actúan como agentes irritantes al aplicarlos puros, mostrando signos de toxicidad aguda al administrarlos vía oral. Concentraciones bajas de estos AEs podrían utilizarse de forma segura en el caso de formulaciones farmacológicas para el tratamiento de la LC u otras enfermedades de la piel y para aditivos en alimentos. Los aceites AE1 y AE4 no fueron tóxicos a las concentraciones evaluadas. El AE2 fue el quimiotipo que mostró una mayor actividad antiparasitaria *in vitro*.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado con recursos del Patrimonio Autónomo Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia la Tecnología y la

Innovación Francisco José de Caldas, Contrato RC-0572 del 2012 y a la Universidad Industrial de Santander. Agradecemos a Jorge Osorio por el apoyo en el mantenimiento y cuidado de los animales, al proyecto Colciencias, Contrato RC-687-2014 y al Laboratorio de Patología, Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander.

REFERENCIAS

- Andrade VA, Almeida AC, Souza DS, Colen K, Macêdo AA, Martins ER, Fonseca FS y Santos RL. 2014. Antimicrobial activity and acute and chronic toxicity of the essential oil of *Lippia organoides*. **Pesq Vet Bras** 34: 1153 - 1161.
- Andrade MA, Azevedo C, Motta F, Santos ML, Silva CL, Santana JM, Bastos IM. 2016. Essential oils: *in vitro* activity against *Leishmania amazonensis*, cytotoxicity and chemical composition. **BMC Complement Altern Med** 16: 444.
- Aular Y, Villamizar M, Pérez Y, Pérez V. 2016. Composición química y toxicidad aguda oral del aceite esencial de *Lippia alba* en ratones. **Salus** 20: 43 - 51.
- Averbeck D, Averbeck L, Dubertret AR, Young y Morlière P. 1990. Genotoxicity of bergapten and bergamot oil in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Photochem Photobiol B** 7: 209 - 229.
- Betancur L, Zapata B, Baena A, Bueno J, Ruíz-Nova CA, Stashenko E, Mesa-Arango AC. 2011. Antifungal, cytotoxic and chemical analyses of essential oils of *Lippia organoides* H.B.K grown in Colombia. **Salud UIS** 43: 141 - 148.
- Bleasel N, Bruce T, Rademaker M. 2002. Allergic contact dermatitis following exposure to essential oils. **Australas J Dermatol** 43: 211 - 213.
- Brito A, Santos D, Rodrigues S, Brito R, Xavier-Filho L. 2013. Plants with anti-*Leishmania* activity: Integrative review from 2000 to 2011. **Pharmacogn Rev** 7: 34 - 41.
- Bruni R, Medici A, Andreotti E, Fantin C, Muzzoli M, Dehesa M, Romagnoli C, Sacchetti G. 2004. Chemical composition and biological activities of *Ishpingo* essential oil, a traditional ecuadorian spice from *Ocotea Quixos (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) Flower Calices*. **Food Chem** 85: 415 - 421.

- Ceridono M, Tellner P, Bauer D, Barroso J, Alépée N, Corvi R, De Smedt A, Fellows MD, Gibbs NK, Heisler E, Jacobs A, Jirova D, Jones D, Kandárová H, Kasper P, Akunda JK, Krul C, Learn D, Liebsch M, Lynch AM, Muster W, Nakamura K, Nash JF, Pfannenbecker U, Phillips G, Robles C, Rogiers V, Van De Water F, Liminga UW, Vohr HW, Watrelos O, Woods J, Zuang V, Kreysa J, Wilcox P. 2012. The 3T3 neutral red uptake phototoxicity test: practical experience and implications for phototoxicity testing – the report of an ECVAM–EFPIA workshop.” **Regul Toxicol Pharmacol** 63: 480 - 488.
- Chen HC, Chang WT, Hseu YC, Chen HY, Chuang CH, Lin CC, Lee MS, Lin MK. 2016. Immunosuppressive effect of *Litsea cubeba* L. essential oil on dendritic cell and contact hypersensitivity responses. **Int J Mol Sci** 17: 1319.
- Cho G, Hough W. 1986. Time course of contact hypersensitivity to DNFB and histologic findings in mice. **J Korean Med Sci** 1: 31-36.
- Croft S, Barrett M, Urbina J. 2005. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends Parasitol** 21: 508 - 512.
- Croft S, Oliario P. 2011. Leishmaniasis chemotherapy-challenges and opportunities. **Clin Microbiol Infect** 17: 1478 - 1483.
- de Oliveira ML, Bezerra BM, Leite LO, Girão VC, Nunes-Pinheiro DC. 2014. Topical continuous use of *Lippia sidoides* cham. Essential oil induces cutaneous inflammatory response, but does not delay wound healing process. **J Ethnopharmacol** 153: 283 - 289.
- Escobar P, Leal SM, Herrera LV, Martinez JR, Stashenko E. 2010. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 105: 184 - 190.
- Ezzine SN, Mrabet N, Khaled A, Zeglaoui F, Kharfi M, Fazaa B, Kamoun MR. 2010. Side effects of meglumine antimoniate in cutaneous leishmaniasis: 15 cases. **Tunis Med** 88: 9 - 11.
- Fachini-Queiro FC, Kummer R, Estevão-Silva C, Carvalho MD, Cunha JM, Grespan R, Cuman R. 2012. Effects of thymol and carvacrol, Constituents of *Thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. **Evid Based Complement Alternat Med** 65: 70 - 76.
- Fernandes ES, Passos GF, Medeiros R, da Cunha FM, Ferreira J, Campos MM, Pianowski LF, Calixto JB. 2007. Anti-inflammatory effects of compounds *alpha*-humulene and *trans*-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **Eur J Pharmacol** 569: 228 - 236.
- Heydorn S, Menné T, Andersen KE, Bruze M, Svedman C, White IR, Basketter DA. 2003. Citral a fragrance allergen and irritant. **Contact Derm** 49: 32 - 36.
- Jałoszyński P, Kujawski M, Czub-Swierczek J, Markowska, K Szyfter. 1997. Bleomycin-induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancer patients studied by comet assay. **Mutat Res** 385: 223 - 233.
- Kanerva L, Elsner P, Wahlberg J, Maibach HI. 2000. **Handbook of occupational dermatology**. Ed Springer- Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany.
- Kaplan DH, Igyártó BZ, Gaspari AA. 2012. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. **Nat Rev Immunol** 12: 114 - 124.
- Kearns M, González NK, Lee F, Rodriguez (incomplete). 2009. **The safety of nanotechnologies at the OECD** in Nanomaterials: risks and benefits. Dordrecht, Springer, The Netherlands.
- Kejlová K, Jírová D, Bendová H, Kandárová H, Weidenhoffer Z, Kolárová H, Liebsch M. 2007. Phototoxicity of bergamot oil assessed by *in vitro* techniques in combination with human patch tests. **Toxicol In Vitro** 21: 1298 - 1303.
- Kremmyda LS, Tvrzicka E, Stankova B, Zak A. 2011. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease: a review. part 2: fatty acid physiological roles and applications in human health and disease. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub** 155: 195 - 218.
- Leal SM, Pino N, Stashenko E, Martinez R, Escobar P. 2013. Antiprotozoal activity of essential oils derived from *Piper* spp. grown in Colombia. **J Essential Oil Res** 25: 512 - 519.
- Leary S, Underwood R, Anthony, Cartner S. 2013. **Guidelines for the euthanasia of animals:**

- american veterinary medical association, Schaumburg, USA
- Liu JW, DeMichele SJ, Palombo J, Chuang LT, Hastilow C, Bobik E Jr, Huang YS. 2004. Effect of long-term dietary supplementation of high-gamma-linolenic canola oil versus borage oil on growth, hematology, serum biochemistry, and N-6 fatty acid metabolism in rats. **J Agric Food Chem** 52: 3960 - 3966.
- Llana M, Maisanaba S, Puerto M, Prieto AI, Pichardo S, Jos Á, Cameán AM. 2014. Evaluation of the mutagenicity and genotoxic potential of carvacrol and thymol using the AMES *Salmonella* test and alkaline, endo III- and FPG-modified comet assays with the human cell line caco-2. **Food Chem Toxicol** 72: 122 - 128.
- Llana M, Maisanaba S, Puerto M, Prieto AI, Pichardo S, Moyano R, González-Pérez JA, Cameán AM. 2016. Genotoxicity evaluation of carvacrol in rats using a combined micronucleus and comet assay. **Food Chem Toxicol** 98: 240 - 250.
- López, MA, Stashenko E, Fuentes JL. 2011. Chemical composition and antigenotoxic properties of *Lippia alba* essential oils. **Genet Mol Biol** 34: 479 - 488.
- Lorenzo D, Paz D, Davies P, Vila R, Cañigueral S, Dellacassa E. 2001. Composition of a new essential oil type of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown from Uruguay. **Flavour Fragr J** 16: 356 - 359.
- Man MQ, Hupe M, Sun R, Man G, Mauro TM, Elias PM. 2012. Topical apigenin alleviates cutaneous inflammation in murine models. **Evid Based Complement Alternat Med** 2012: 1 - 7.
- Mihara S, Shibamoto T. 2015. The role of flavor and fragrance chemicals in TRPA1 (transient receptor potential cation channel, member a1) activity associated with allergies. **Allergy Asthma Clin Immunol** 11: 11.
- Mohamed AN. Leishmaniasis and malignancy: a review and perspective. 2017. **Clin Skin Cancer** 2: 54 - 58.
- Monzote L, Pastor J, Scull R, Gille L. 2014a. Antileishmanial activity of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and its main components against experimental cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. **Phytomedicine** 21: 1048 - 1052.
- Monzote L, Piñón A, Sculli R, Setzer WN. 2014b. Chemistry and leishmanicidal activity of the essential oil from *Artemisia absinthium* from Cuba. **Nat Prod Commun** 9: 1799 - 1804.
- Mowitz M, Svedman C, Zimerson E, Isaksson M, Pontén A, Bruze M. 2017. Simultaneous patch testing with fragrance mix I, fragrance mix II and their ingredients in southern Sweden between 2009 and 2015. **Contact Dermatitis** 77: 280 - 287.
- Neira L, Stashenko E, Escobar P. 2014. Actividad antiparasitaria de extractos de plantas colombianas de la familia Euphorbiaceae. **Salud UIS** 46: 15 - 22.
- Neira L, Vera A, Escobar P. 2016. Genotoxicidad del nifurtimox en diferentes líneas celulares utilizando el ensayo cometa. **Rev Med Risaralda** 22: 3 - 8.
- OECD 2002. **Test No. 423: Acute oral toxicity - acute toxic class method**, OECD Publishing, Paris, France.
- OECD 2014. **Test No. 474: Mammalian erythrocyte micronucleus Test**. OECD Publishing, Paris.
- OECD 2015. **Test No. 404: Acute dermal irritation/corrosion**, OECD Publishing, Paris.
- OECD 2016. **Test No. 489: In vivo mammalian alkaline comet assay**. OECD Publishing, Paris.
- Olivero-Verbel J, Guerrero-Castilla A, Stashenko E. 2010. Toxicity of the essential oil of the citral chemotype of *Lippia Alba* (Mill.) N. E. Brown. **Acta Toxicol Argent** 18: 21 - 27.
- Patino LH, Méndez C, Rodríguez O, Romero Y, Velandia D, Alvarado M, Pérez J, Duque MC, Ramírez JD. 2017. Spatial distribution, *Leishmania* species and clinical traits of cutaneous leishmaniasis cases in the Colombian army. **PLoS Negl Trop Dis** 11: e.
- Pastor J, García M, Steinbauer S, Setzer WN, Scull R, Gille L, Monzote L. 2015. Combinations of ascaridole, carvacrol, and caryophyllene oxide against *Leishmania*. **Acta Trop** 145: 31 - 38.
- Puertas-Mejía M, Hillebrand S, Stashenko E, Winterhalter P. 2002. *In vitro* radical scavenging activity of essential oils from Colombian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare L.*) essential oil. **Flavour Fragr J** 17: 380 - 384.

- Quintero N, Córdoba Y, Stashenko EE, Fuentes JL. 2017. Antigenotoxic effect against ultraviolet radiation-induced DNA damage of the essential oils from *Lippia* species. **Photochem Photobiol** 93: 1063 - 1072.
- Röse L, Schneider C, Stock C, Zollner TM, Döcke WD. 2012. Extended DNFB-induced contact hypersensitivity models display characteristics of chronic inflammatory dermatoses. **Clin Exp Dermatol** 21: 25 - 31.
- Saldanha AR., Sierra G, Conceição EM, Oliveira M. 2000. Comparative study between sodium stibogluconate BP 88R and meglumine antimoniate for cutaneous leishmaniasis treatment: Efficacy and safety. **Rev Soc Bras Med Trop** 33: 383 - 388.
- Shen T, Zhu QX, Yang S, Wu CH, Zhang HF, Zhou CF, Zhang XJ. 2008. Trichloroethylene induced cutaneous irritation in BALB/c hairless mice: histopathological changes and oxidative damage. **Toxicology** 248: 113 - 120.
- Silva FV, Guimarães AG, Silva ER, Sousa-Neto BP, Machado FD, Quintans-Júnior LJ, Arcanjo DD, Oliveira FA, Oliveira RC. 2012. Anti-inflammatory and anti-ulcer activities of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano. **J Med Food** 15: 984 - 991.
- Sivigila. 2016. Boletín epidemiológico. **Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública - SIVIGILA**.
- Stashenko E, Martínez JR, Cala M, Durán C, and Caballero D. 2013. Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. **J Sep Sci** 36: 192 - 202.
- Stashenko E, Martínez JR, Durán C, Córdoba Y, y Caballero D. 2014. Estudio comparativo de la composición química y la actividad antioxidante de los aceites esenciales de algunas plantas del género *Lippia* (verbenaceae) cultivadas en Colombia. **Rev Acad Colomb Cienc Exactas Fis Nat** 38: 89 - 105.
- Taylor RM. 1986. Histopathology of contact dermatitis. **Clin Dermatol** 4: 18 - 22.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen** 35: 206 - 221.
- Tisserand R, Young R. 2014. **Appendix b- examples of drug substrates for CYP enzymes in essential oil safety**. Elsevier Health Sciences, Ciudad, País.
- Turina, AV, Nolan, J, Zygadlo MA, Perillo. 2006. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. **Biophys Chem** 122: 101 - 113.
- Vasquez MZ. 2010. Combining the *in vivo* comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation. **Mutagenesis** 25: 187 - 199.
- Vélez ID, Colmenares LM, Muñoz CA. 2009. Two cases of visceral leishmaniasis in Colombia resistant to meglumine antimonial treatment. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 51: 231 - 236.
- Vera SS, Zambrano DF, Méndez-Sánchez SC, Rodríguez-Sanabria F, Stashenko EE, Duque Luna JE. 2014. Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **J Parasitol Res** 113: 2647 - 2654.
- Veras HN, Araruna MK, Costa JG, Coutinho HD, Kerntopf MR, Botelho MA, Menezes IR. 2013. Topical antiinflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* cham: possible mechanism of action. **Phytother Res** 27: 179 - 185.
- Viana GS, do Vale TG, Rao VS, Matos F. 1998. Analgesic and anti-inflammatory effects of two chemotypes of *Lippia alba*: a comparative study. **Pharm Biol** 36: 347 - 351.
- Zhang M, Wan C, Ji B, Zhang Z, Zhu H, Tian N, La Y, Huang K, Jiang L, He G, Gao L, Zhao X, Shi Y, Huang G, Feng G, He L. 2009. Proteome alteration of U251 human astrocytoma cell after inhibiting retinoic acid synthesis. **Mol Cell Biochem** 323: 185 - 193.